

Trabajo Fin de Grado

Mecanismo de muerte celular inducida por el
inhibidor de Btk Ibrutinib en células de mieloma
múltiple

Autor/es

Andrea Romero Martín

Director/es

Isabel Marzo Rubio

Facultad de Ciencias
2015

ÍNDICE

1. Resumen.....	pág.2
2. Antecedentes.....	pág.3
2.1. El mieloma múltiple.....	pág.3
2.2. Tirosin kinasa de Bruton.....	pág.3
2.3. Proteínas de la familia Bcl-2.....	pág.4
2.3.1. Proteínas antiapoptóticas.....	pág.5
2.3.2. Proteínas proapoptóticas.....	pág.5
2.3.3. Proteínas proapoptóticas “BH3-only”	pág.7
3. Planteamiento y objetivos del trabajo.....	pág.7
4. Materiales y métodos.....	pág.9
4.1. Cultivos celulares.....	pág.9
4.2. Ensayos de citotoxicidad.....	pág.9
4.2.1. Ensayo de reducción del MTT.....	pág.9
4.2.2. Cuantificación de apoptosis mediante marcaje con anexina V.....	pág.10
4.3. Microscopia de fluorescencia.....	pág.11
4.4. Análisis de la fosforilación de Bcl-2 mediante Western-Blot.....	pág.11
5. Resultados y discusión.....	pág.13
5.1. Evaluación de la citotoxicidad de los diferentes fármacos sobre la línea celular MM.1S.....	pág.13
5.2. Evaluación de la posible sinergia entre el Ibrutinib y diferentes miméticos de “BH3-only” sobre la línea celular MM.1S.....	pág.15
5.2.1. Evaluación de sinergia entre Ibrutinib y ABT-199.....	pág.15
5.2.2. Evaluación de sinergia entre Ibrutinib y ABT-737.....	pág.16
5.3. Microscopia de fluorescencia.....	pág.17
5.4. Análisis de la fosforilación de Bcl-2.....	pág.19
6. Conclusiones.....	pág.20
7. Bibliografía.....	pág.21

1. RESUMEN

En las células de mieloma múltiple se ha visto una sobreexpresión de la quinasa Btk y las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, lo que aumenta su capacidad proliferativa y de evasión de la apoptosis. Lo que plantea la inhibición de la Btk, mediante Ibrutinib, y el contrarrestar el efecto de las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2, mediante los análogos de BH3 ABT-199 y ABT-737, como un posible tratamiento para dicho tipo de cáncer.

En este estudio se ha evaluado la actividad de dichos fármacos sobre la línea celular MM.1S, por separado y combinados, mediante diferentes técnicas. Los resultados de estos estudios reflejan que Ibrutinib es un citostático que induce catástrofe mitótica en las células; y pese a ser un inhibidor de quinasas induce la fosforilación de Bcl-2. Por otro lado, tanto ABT-199 como ABT-737 son capaces de aumentar la sensibilidad celular ante el inhibidor de la Btk, mejorando su actividad, lo que posibilita el uso de combinaciones de Ibrutinib y BH3 miméticos en terapia.

ABSTRACT

Multiple myeloma cells show an over-expression of Btk kinase and antiapoptotic proteins from Bcl-2, what increases the proliferative capacity of the cell and its ability to avoid apoptosis. This determines that the inhibition of Btk, using Ibrutinib, and the counteraction of the antiapoptotic Bcl-2 proteins effects, using ABT-199 and ABT-737 (BH3 mimetic compounds), may work as a treatment for multiple myeloma.

In this study, the activity of these drugs on MM.1S cell line, individually and in combination, has been evaluated using different techniques. The results show that Ibrutinib is a cytostatic, which induces mitotic catastrophe in cells and Bcl-2 fosforilation in spite of being a kinase inhibitor. Also, both the ABT-199 and the ABT-737 are capable of increasing cell sensitivity to Btk's inhibitor, improving its activity, suggesting that combinations of Ibrutinib and BH3 mimetics could be useful in the therapy of multiple myeloma.

2. ANTECEDENTES

2.1. EL MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) humano es una neoplasia maligna de células B plasmáticas, caracterizado por la acumulación de células plasmáticas tumorales en la médula ósea. Este tipo de cáncer representa el 10% de las neoplasias hematológicas y el 1% de todos los cánceres. En la actualidad el MM se considera una enfermedad incurable, con una supervivencia a los 5 años alrededor del 40% (1).

Las células de mieloma múltiple derivan de células B post-germinales, y son estimuladas mediante factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, activando la vía de señalización NF- κ B. Esta vía regula la expresión de proteínas implicadas en proliferación, anti-apoptosis y secreción de citoquinas. NF- κ B es un heterodímero, formado por p50 y p65, presente en el citosol unido al inhibidor I κ B α . Tras la estimulación, I κ B α es fosforilado para ser degradado en el proteasoma, y NF- κ B queda libre para viajar hasta el núcleo (1).

2.2. TIROSIN KINASA DE BRUTON

La enzima tirosin kinasa de Bruton (Btk) es la encargada de acoplar las señales de supervivencia que llegan a la superficie celular, como el factor de activación de células B (BAFF) y el BCR, a la vía NF- κ B (1), (Fig. 1). Recientes estudios, sobre perfil de expresión genómica e inmunoblotting, han demostrado una robusta expresión de Btk en las células MM (2). Por todo esto, Btk se ha planteado como diana en los tratamientos de neoplasias malignas de células B con excelente eficacia (2).

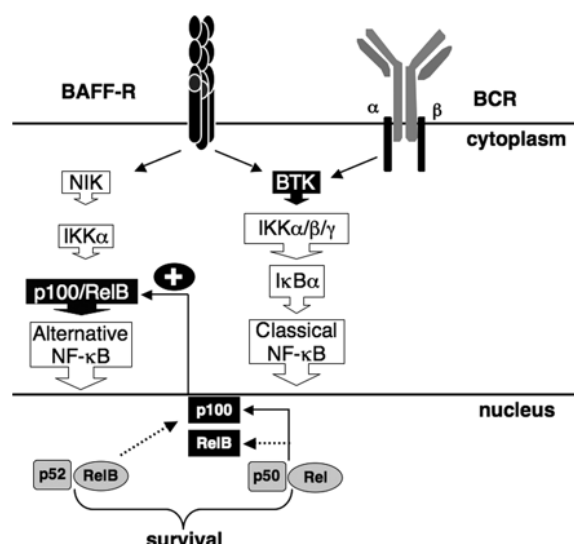


Figura 1. Modelo de activación de la vía NF- κ B tanto clásica como alternativa. Btk está implicada en la activación de la ruta clásica de NF- κ B, a su vez, esta vía sirve para sostener la activación de la vía alternativa NF- κ B. De forma, que la inactivación de Btk a la activación de ambas rutas.(3)

Ibrutinib (PCI-32765) es un inhibidor de la Btk que se une irreversible y específicamente a esta a través de un residuo de cisteína (Cys481) presente sólo en 10 de las más de 500 kinasas humanas (2). Este fármaco ya ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de linfoma de células del manto y leucemia linfocítica crónica (CLL), por su eficacia

y baja toxicidad (4). También, se ha sometido a estudio su actuación en el tratamiento de mieloma múltiple, obteniendo resultados muy positivos:

- Bloquea la activación basal e inducida de Btk, y disminuye las vías de señalización NF- κ B, STAT3, ERK1/2 y Akt (2).
- Inhibe la fosforilación de p65 (serina536) e I κ B α , impidiendo la translocación nuclear de NF- κ B. Y dando como resultado una disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas reguladas por NF- κ B, como son FLIP_L, Bcl-x_L y survivina, que se ha visto protegen en diversos cánceres de la muerte inducida por fármacos (1).
- Induce la apoptosis mediada por caspasas (1).
- Reduce la secreción de múltiples citoquinas y quimiocinas en co-cultivos de células MM y células de la médula ósea (BMSCs) (2).
- La inhibición de Btk con Ibrutinib no tiene efectos citotóxicos sobre monocitos primarios, lo que sugiere que su efecto sobre células plasmáticas malignas es a través de una citotoxicidad específica (1).

2.3. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2

Por otro lado, en la supervivencia celular juegan un papel muy importante las proteínas de la familia Bcl-2. Estas se encargan de regular la inducción de la apoptosis a través de la vía intrínseca (Fig. 2). Dentro de esta familia todos los miembros comparten al menos uno de los dominios BH (BH1-BH4); distinguimos 2 grandes grupos, las proteínas antiapoptóticas y las proapoptóticas, estas últimas se subdividen en las multidominio y las "BH3-only". Tanto la sobreexpresión de genes antiapoptóticos, como la disminución o mutación disfuncional en genes proapoptóticos de esta familia, producen un aumento de la resistencia a la apoptosis de las células tumorales (5). En las neoplasias hematológicas es frecuente la evasión de la apoptosis por una sobreexpresión de Bcl-2 (6).

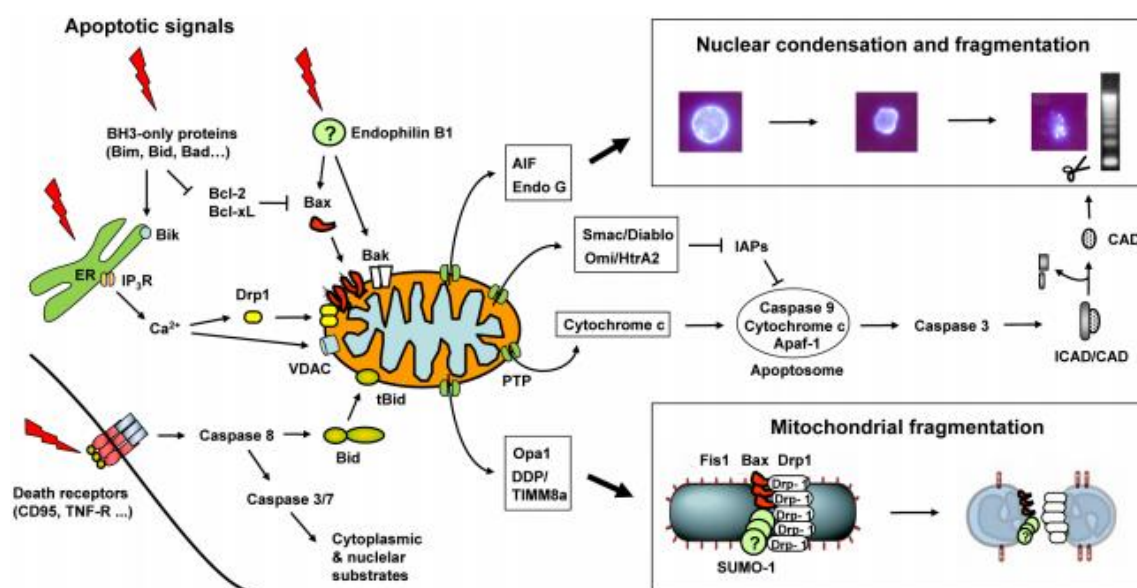


Figura 2. Vía intrínseca de la apoptosis. (7)

2.3.1. Proteínas antiapoptóticas.

Todos sus miembros (Bcl-2, Bcl-W, Bcl-B y Bcl-X_L) contienen los cuatro dominios de homología BH, excepto Mcl-1 y A1 (5).

El gen bcl-2 codifica para una proteína de membrana que podemos encontrar en la cara citoplasmática de la membrana mitocondrial externa, la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático. El oncogén Bcl-2 se debe a una translocación cromosómica t (14; 18) que yuxtapone el gen bcl-2 con el locus de cadena pesada de las inmunoglobulinas (8). Esta fusión da lugar a unos niveles elevados de RNA bcl-2 y proteína, que tienen como consecuencia un bloqueo de la muerte celular programada y un mantenimiento de la supervivencia celular bajo condiciones que normalmente inducirían la muerte de la célula. En concreto, Bcl-2 bloquea aparición de “blebs” (protuberancias) apoptóticos en la membrana plasmática, contracción del citoplasma, condensación nuclear, y escisión endonucleolítica del DNA (9).

La proteína Bcl-2 sufre modificaciones post-traduccionales para regular su actividad; específicamente, la fosforilación de la serina 70 es necesaria para una completa y potente función anti-apoptótica (10). Se ha demostrado que Bcl-2 es sustrato de diversas quinasas, y también de varias fosfatasas, siendo la fosforilación un mecanismo de regulación reversible(11).

2.3.2. Proteínas proapoptóticas multidominio

En este grupo se incluyen las proteínas Bak, Bax y Bok.

Tienen función apoptótica, y contienen tres de los dominios BH (BH1-BH3). Bak y Bax en condiciones basales se encuentran de forma inactiva como monómeros, los estímulos que activan la vía intrínseca mitocondrial a través de las interacciones de las proteínas de la familia Bcl-2 dan lugar a la activación de Bak y Bax. Estas oligomerizan en la mitocondria formando el llamado poro de la membrana externa mitocondrial (MOMP), permitiendo la liberación de proteínas apoptogénicas que en una célula “sana” residen en el espacio intermembrana, como son el citocromo c, factor de inducción de la apoptosis (AIF), Smac/DIABLO, EndoG y Omi/HtrA2 (5)(12).

2.3.3. Proteínas proapoptóticas “BH3- only”

Los miembros de este grupo son Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Spike, bNIP3, Hrk, Noxa y Puma.

Contienen sólo el dominio BH3, es suficiente para su función apoptótica, este dominio está constituido por 9-16 aminoácidos y tiene estructura de hélice alfa anfipática. Se han propuesto diferentes modelos para su mecanismo de actuación, según el modelo indirecto las proteínas “BH3-only” se unen a los miembros antiapoptóticos suprimiendo su actividad mediante la liberación de Bax y Bak. Por otro lado, el modelo directo sugiere que algunas proteínas “BH3-only” son activadores que se unen directamente a Bax y Bak activándolos, mientras que otras son sensibilizadores que se unen a las antiapoptóticas liberando a las “BH3-only” activadoras. Y por último, se ha propuesto un modelo alternativo que intenta unificar los dos anteriores. En cualquier caso, las proteínas “BH3-only” interaccionan con las proteínas

antiapoptóticas; estudios sobre esta interacción han revelado que en las proteínas de supervivencia celular los tres dominios BH1, BH2 y BH3 forman un hueco hidrofóbico al que puede unirse una hélice anfipática alfa de aproximadamente 24 residuos, es decir, un dominio BH3 (5)(13).

En relación a lo expuesto en los párrafos anteriores, la actividad proapoptótica de las proteínas “BH3-only” se ha convertido en un mecanismo modelo a simular por nuevos fármacos antitumorales. El diseño de estos fármacos se ve favorecido por dos hechos:

- Los nuevos conocimientos sobre la estructura formada entre los dominios BH3 y las proteínas antiapoptóticas permiten un diseño racional de estos fármacos.
- Los dominios BH3 son relativamente pequeños, lo que hace posible la síntesis de pequeños péptidos o moléculas farmacológicamente activas que reproduzcan su función proapoptótica en las células (12).

El ABT-737 es uno de estos fármacos; se trata de un pequeño compuesto orgánico identificado mediante resonancia magnética nuclear (NMR) basada en el screening de inhibidores de Bcl-2. Además, inhibe también las proteínas Bcl-x_L y Bcl-w, pero no Mcl-1 ni A1. El hecho de que no actúe sobre estas dos últimas da lugar a que por sí sólo el ABT-737 no sea un eficiente inductor de la apoptosis, pero se ha visto que muestra sinergia con otros compuestos. Otros autores han descrito que este compuesto induce apoptosis selectivamente en células MM, pero no en células normales(12)(14).

Otro fármaco de este tipo es el ABT-199, en este caso se trata de un mimético de BH3 de segunda generación, más específico ya que se une únicamente a Bcl-2. Se generó por reingeniería a partir navitoclax (ABT-263), fármaco capaz de inhibir Bcl-2, Bcl-x_L y Bcl-w. En modelos animales se ha visto que promueve la regresión de neoplasias hematológicas humanas dependientes de Bcl-2 (14)(15)(16).

Como bloqueador de la Btk elegimos Ibrutinib (*Selleckchem*), apoyándonos en las evidencias que lo presentan como un buen inhibidor de la supervivencia de las células tumorales (ver antecedentes). Además, dado que se trata de un inhibidor de quinasas es posible que impida la fosforilación de Bcl-2, que tal y como se ha indicado anteriormente es un mecanismo de regulación post-traducciona l de esta proteína antiapoptótica.

Por otro lado, respecto a las proteínas de la familia Bcl-2, la inhibición de las proteínas antiapoptóticas de la familia puede abordarse bien mediante moléculas de RNA antisentido que directamente impide su expresión, o bien mediante el desarrollo de moléculas similares a las proteínas “BH3-only” que interaccionan con ellas permitiendo la apertura del poro mitocondria l. Esta segunda estrategia es mucho más prometedora, porque pese a los diversos ensayos con moléculas anti-Bcl-2 no se ha comprobado un efecto claro en MM y otros tipos de cáncer (13). Por lo tanto, decidimos evaluar la posible sinergia de Ibrutinib con los compuestos ABT-737 y ABT-199 (separadamente), miméticos de BH3 de primera y segunda generación respectivamente (amablemente cedidos por Marina Konopleva, del Centro MD Anderson Cancer’s Centre Houston).

Para ello evaluaremos mediante diferentes técnicas la actuación individual de cada fármaco, y en conjunto, sobre un cultivo celular.

Los objetivos concretos de este trabajo fin de grado por tanto serán:

- Evaluar la sensibilidad de las células de mieloma múltiple MM.1S a Ibrutinib, ABT-199, y ABT-737. Y establecer la IC₅₀ en cada caso.
- Evaluar la posible sinergia para las siguientes parejas de fármacos:
 - Ibrutinib + ABT-199.
 - Ibrutinib + ABT-737.
- Comprobar si el fármaco Ibrutinib es capaz de inhibir la fosforilación de la proteína Bcl-2, y así intentar dilucidar su mecanismo de actuación en mayor profundidad.
- Observar las alteraciones morfológicas nucleares producidas por el tratamiento con los fármacos y sus combinaciones con el fin de determinar el modo de muerte celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CULTIVOS CELULARES

Durante este trabajo se ha utilizado la línea celular MM.1S (amablemente cedida por el Dr. Atanasio Pandiella, del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca), la cual corresponde a linfoblastos tipo B aislados a partir de sangre periférica de un enfermo de mieloma tipo inmunoglobulina A lambda (19).

Las células se han cultivado en medio RPMI (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2mM y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomicina 100µg/ml). La densidad celular del cultivo ha sido de 2.5×10^5 cel/ml, se ha mantenido en un incubador termostatzado (*Heraeus Cell*) a 37°C, en aire saturado de humedad y con 5% CO₂. Todas las manipulaciones del cultivo se han realizado con material estéril y en campanas de flujo laminar vertical (*Telstar*).

La densidad y viabilidad celular se han determinado mediante tinción por exclusión de azul Trypán (al 0,4% en NaCl 0.15M) y conteo empleando una cámara de Neubauer. El azul tripán es un colorante vital capaz de penetrar en las células cuya membrana esté dañada; por tanto al microscopio vemos azules las células no viables, y las vivas sin teñir, porque su membrana sigue siendo selectiva. Las fórmulas que se han empleado en cada caso:

- Densidad celular:
$$n^{\circ} \text{células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas} \times 10^4 \times 2}{n^{\circ} \text{cuadrantes}}$$
- Viabilidad celular:
$$\% \text{viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{células vivas}}{n^{\circ} \text{células totales}}$$

En todos los experimentos realizados las células presentaban una viabilidad superior al 90%.

En los momentos en que no se ha podido subcultivar cada dos o tres días (indicaciones ATCC) el cultivo se ha mantenido congelado a -80°C en medio completo suplementado con DMSO al 10% y a una densidad de $10\text{--}12 \times 10^6$ cel/mL.

4.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

4.2.1. ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MTT

Para determinar la viabilidad del cultivo celular una vez ha sido tratado con las diferentes concentraciones de fármacos, se ha empleado el método de Mosmann modificado, basado en la reducción del MTT (bromuro de dimetil-tiazoliltetrazoilo) (20). Este consiste en la reducción de la sal de tetrazoilo, soluble y de color amarillo, a un formazán insoluble de color azul. Esta reducción es llevada a cabo en el interior de la células por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Así, la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viables, pues en las células no viables las reductasas estarán desnaturalizadas.

Para llevar a cabo el experimento se han utilizado placas de 96 pocillos de fondo plano, en cada pocillo se han sembrado 50µL de cultivo a una densidad celular de 10^6 cel/mL, y se han añadido otros 50µL de medio con el fármaco disuelto. En cada caso nos han quedado las concentraciones de fármaco finales indicadas en el apartado de Resultados. Cada punto

experimental se hizo por quintuplicado. Como control se dispusieron células sin tratar, o en el caso de las combinaciones, células con la concentración fija del ABT correspondiente en cada caso. Y como blanco se empleó medio de cultivo RPMI. A las 24 horas, se añadieron a cada pocillo 10µL del reactivo de MTT (preparado a una concentración de 5mg/ml en PBS) y se dejó incubar en la estufa a 37°C durante 2-3 horas. Pasado este tiempo la placa se centrifugó durante 20 minutos a 1100xg (*Beckman Coulter*), se eliminó el sobrenadante por inversión sobre papel y se añadieron 100µL de DMSO a cada pocillo. Para conseguir una buena disolución de los cristales se utilizó el agitador de placas (*Bioblock*). Finalmente, se midió la absorbancia de la placa a 490 nm utilizando un lector de placas ELISA MR5000 (*Dynatech*).

En los casos de ensayos de los fármacos por separado, los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad de las células expuestas a las diferentes concentraciones de fármaco respecto al control de células no tratadas. Y en el caso de las combinaciones, los resultados expuestos son el porcentaje de viabilidad de las células expuestas a las diferentes concentraciones de Ibrutinib respecto al control de células tratadas con la concentración fija del ABT correspondiente en cada caso.

Para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos cada experimento se ha hecho por duplicado, obteniendo los resultados a partir de los valores medios obtenidos en los experimentos independientes.

4.2.2. CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA V

La anexina V es una proteína que se une a fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina, en una reacción dependiente de calcio. Uno de los indicadores de apoptosis es la externalización de fosfatidilserina porque este fosfolípido se encuentra en la monocapa interna de la membrana de células normales, mientras que en estadios tempranos de apoptosis se transloca a la cara externa. En este estudio, se ha utilizado anexina V acoplada a el fluoróforo FITC (excitación 494nm - emisión 518nm), para posteriormente poder evaluar mediante citometría de flujo el porcentaje de células muertas.

Para el experimento se utilizaron placas de 24 pocillos de fondo plano, en cada pocillo se sembraron 500µL de una suspensión celular a 5×10^5 cel/mL. Posteriormente, se añadió la cantidad de droga adecuada para conseguir la concentración final indicada en los resultados.

Pasadas 24 horas, se llevó a cabo el marcaje con anexina V- FITC, para ello se pasó el contenido de cada pocillo a un tubo de citómetro y se centrifugó durante 2 minutos a 1700xg. Seguidamente, se añadieron a cada muestra 1.5µL de anexina V-FITC en 98.5µL de ABB 1X (Annexin Binding Buffer, composición: 10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl_2 , pH7.4). Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron 200µL de ABB 1X a tubo, y se analizaron los resultados mediante citometría de flujo (*BD FACSCalibur*).

4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Durante la apoptosis el DNA cromosómico generalmente es fragmentado como resultado de la escisión entre nucleosomas. La cromatina se condensa y a continuación el núcleo se disgrega en pequeños fragmentos. Finalmente, la célula encoge y se rompe en fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Para analizar estas características morfológicas nucleares típicas de la apoptosis se tiñeron las células con el colorante nuclear Hoechst 33342. La célula es permeable a este colorante que se une al surco menor del DNA, preferentemente a las regiones ricas en A-T. Se excita con una longitud de onda de 350nm y emite entre 460 y 490nm, dando lugar a una fluorescencia azul.

En la realización del ensayo, se sembraron 3 pocillos con 5×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Una de las muestras quedó como control y de las otras dos, a una de ellas se añadió Ibrutinib y ABT-199 ($8 \mu\text{M}$ y 500nM respectivamente), y a la otra Ibrutinib y ABT-737 ($5,3 \mu\text{M}$ y 250nM respectivamente). Pasadas 24 horas, el contenido de cada pocillo se trasvasó a un microtubo y se centrifugó durante 5 minutos a $100 \times g$ (*Beckman, Microfuge 11*), seguidamente se lavó con PBS estéril y se resuspendió en paraformaldehído 1%. Tras dejar 10-15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron y lavaron de nuevo en PBS. Resuspendidas en PBS las células se almacenaron a 4°C durante 2 semanas.

Finalmente, las muestras se añadieron sobre cubres con poly-L-lisina (0.1% w/v en agua) colocados en el interior de 3 pocillos en una placa de 24. Tras centrifugar 5 minutos a $233 \times g$ se tiñeron las células con el colorante Hoechst 33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$ en *Mowiol®*), y se guardaron en la nevera a 4°C durante toda la noche, para ser observadas al microscopio de fluorescencia (*Nikon ECLIPSE 50i*) al día siguiente.

4.4. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE Bcl-2 MEDIANTE WESTERN-BLOT

Para evaluar la fosforilación de Bcl-2 en presencia de Ibrutinib vamos a realizar un Western-blot utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo anti-fosfoBcl-2 monoclonal, de conejo (*Merck Millipore*). Por lo que el cómo anticuerpo secundario utilizaremos un anti-rabbit marcado con peroxidasa, en concreto anti-rabbit IgG policlonal de cabra (*Sigma-Aldrich*).

En primer lugar, se sembraron 2 pocillos con 5ml a 5×10^5 cel/ml, en una placa de 6 pocillos. A una de las muestras se añadió Ibrutinib, a una concentración $10 \mu\text{M}$; y a la otra se añadió la cantidad equivalente de DMSO. Pasadas 24 horas, se cuantificaron las células viables en cada caso; seguidamente, se trasvasaron los 5ml a un Falcon de 15ml y se centrifugaron a $233 \times g$ durante 5 minutos. Se lavó con 1ml PBS, se resuspendió en otro mililitro de PBS y se trasvasó a un par de microtubos. Una vez en los microtubos se centrifugó, eliminó el sobrenadante y resuspendió en tampón de lisis 1x (Tritón X-100 1%(v/v), cloruro de sodio 150mM, EDTA 1mM, ortovanadato 1mM, pirofosfato sódico 10mM, leupeptina $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, fluoruro de sodio 10mM, PMSF 1mM, Tris HCl 50mM pH7.6, glicerol 10%(v/v)) se añadieron $20 \mu\text{L}/10^6$ células. Se incubó a 4°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugó 30 minutos a 4°C a $20000 \times g$ (*Eppendorf, Centrifuge 5417R*) y se recolectaron los sobrenadantes, a los cuales se añadió la cantidad correspondiente de tampón de lisis 3x (Tris HCl 150mM pH 7.4, SDS 3%(p/v), molibdato de sodio di-hidratado 0.3mM, pirofosfato de sodio 30mM, fluoruro de

sodio 30mM, glicerol 30%(v/v), β -mercaptoetanol 30%(v/v), azul de bromofenol 0.06%(p/v)) para que quedase a una concentración 1x.

Una vez finalizada la extracción, se calentaron las muestras durante 5 minutos a 95°C, y se cargaron 15 μ L de cada muestra en un gel SDS-poliacrilamida al 12%. El gel se dejó correr 90 minutos a 180V y 20mA, para separar las proteínas en función de su peso molecular. La composición del gel de concentración fue: acrilamida/bis al 2%, Tris-HCl 125mM pH6.8, SDS al 0.1%, persulfato amónico al 0.1%, TEMED al 0.01%. La composición del gel de resolución fue: acrilamida/bis 12%, Tris-HCl 370mM pH8.8, SDS al 0.1%, persulfato amónico 0.1%, TEMED al 0.01%. La composición del tampón de electroforesis fue: Tris base 25mM, glicina 192mM y SDS al 0.1%. Como marcador de peso molecular se empleó *Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, que contiene 10 proteínas con pesos moleculares que van desde 10 a 260kDa.

Una vez realizada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, para lo que se utilizó tampón de transferencia (Tris 25mM, 192mM glicina, 3.5mM SDS, pH8.3) al 80% en metanol, y un equipo de transferencia semi-seca (*BioRad, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell*). Las condiciones de la transferencia fueron 20V, 400mA durante 75 minutos.

Con las proteínas fijadas en la membrana de nitrocelulosa, el primer paso fue bloquear la membrana, con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B 1x (Tris 6mM, glicina 4.6mM, SDS 0.0046%(p/v)), durante 30 minutos. Seguidamente se lavó 3 veces durante 10 minutos con tampón B 1x, tras esto se añadió el anticuerpo primario (diluido 1:1000 en solución de PBS-Tween20 al 0,1%, 5% BSA, 0.05% NaAc) y se dejó incubando 12 horas a 4°C. Pasado este tiempo, la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos, a continuación se añadió el anticuerpo secundario diluido 20000 veces en una mezcla de leche en polvo y tampón de lavado a partes iguales. Tras incubarlo 1 hora, y lavar 3 veces durante 10 minutos, se añadió a la membrana la solución de revelado *Pierce ECL2Western, Blotting Substrate (Life technologies)*. Pasados dos minutos, se reveló la membrana manteniendo 5 minutos en el cassette de revelado.

Finalmente, se llevó a cabo un control de carga mediante el revelado de actina del mismo modo que se ha indicado para Bcl-2 fosforilada. En este caso se utilizó como anticuerpo primario anti- β -actina monoclonal producido en ratón (*Sigma-Aldrich*), por lo que como secundario se utilizó anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa. En este caso para el revelado se utilizó la solución *Pierce ECL Western, Blotting Substrate (Life technologies)*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXIDAD DE LOS DIFERENTES FÁRMACOS SOBRE LA LÍNEA CELULAR MM.1S

Para evaluar el efecto de los tres fármacos que se han empleado a lo largo de este estudio, se ha utilizado el método de Mosmann modificado(20). Y a partir de los resultados obtenidos se han determinado las diferentes dosis letales medias (IC_{50}).

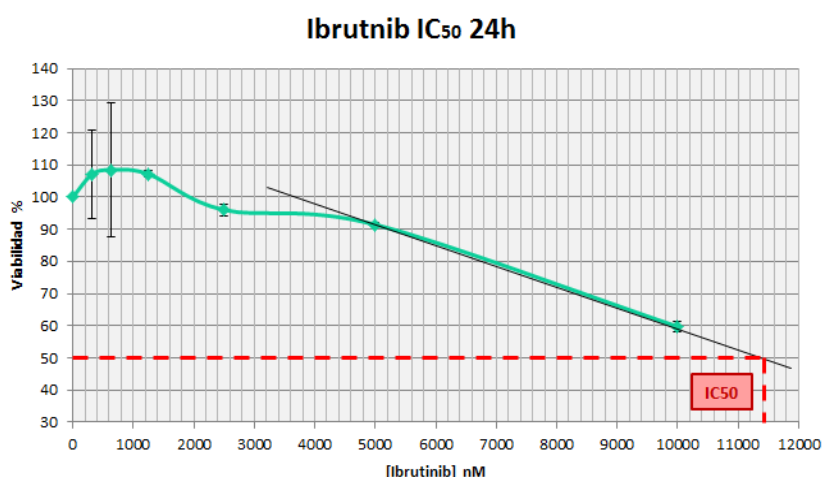


Figura 4. Viabilidad celular (%) tras 24 h en presencia de Ibrutinib a diferentes concentraciones. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Recta negra representando la tendencia a mayores concentraciones de fármaco. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 24h.

Al tratar la línea celular MM.1S con Ibrutinib vemos que conforme aumenta la concentración de fármaco disminuye la viabilidad celular. Por lo tanto, podemos afirmar que el inhibidor de la Btk tiene efecto sobre la viabilidad de estas células de mieloma múltiple a las concentraciones dadas.

En los experimentos realizados a 24 horas, las concentraciones de Ibrutinib evaluadas no llegan a causar la muerte del 50% de la población celular. Pero, dada la pequeña desviación estándar que se muestra en la figura 4 para los resultados obtenidos a las concentraciones de 2,5, 5 y 10 μ M, podemos extrapolar un valor de dosis letal media a partir de la tendencia del gráfico (valor recogido en la tabla 1).

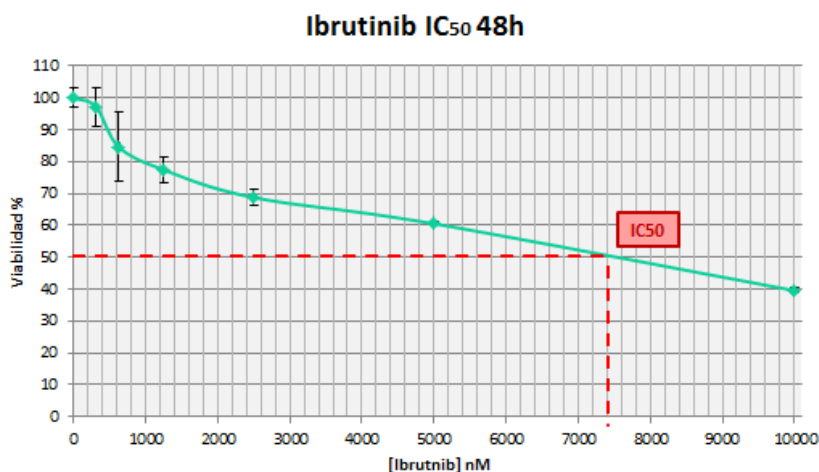


Figura 5. Viabilidad celular (%) tras 48h en presencia de Ibrutinib a diferentes concentraciones. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 48h.

Por otro lado, podemos establecer la dosis letal media a 48 horas a partir de la figura 5.

$$IC_{50} = 7,4 \mu M$$

Respecto a los miméticos de “BH3-only” ABT-199 y ABT-737, a la vista de las Figuras 6 y 7, se confirma un efecto citotóxico sobre las células MM.1S.

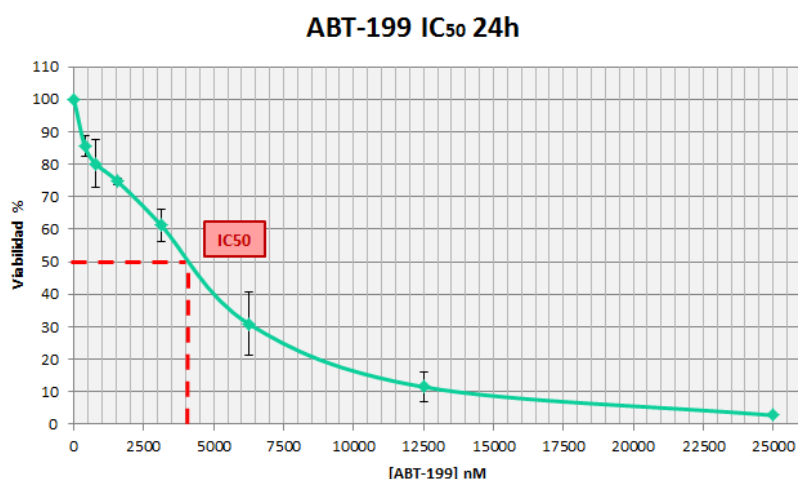


Figura 6. Viabilidad celular (%) tras 24 h en presencia de ABT-199 a diferentes concentraciones. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 24h.

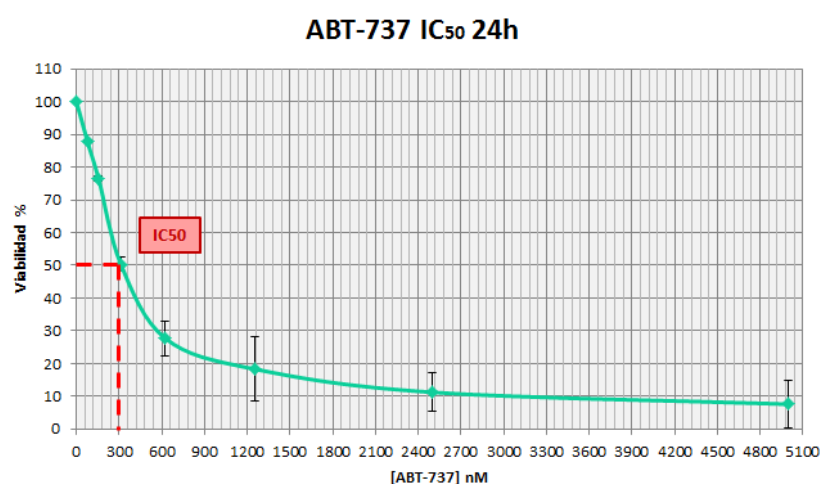


Figura 7. Viabilidad celular (%) tras 24 h en presencia de ABT-737 a diferentes concentraciones. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 24h.

Por otro lado, en la figura 7 vemos que el ABT-737 tiene un efecto negativo sobre la viabilidad de la línea celular MM.1S bastante mayor al de los dos compuestos anteriores.

Comparando los valores recogidos en la Tabla 1, podemos afirmar el Ibrutinib a las dosis analizadas, sobre la línea celular MM.1S, es citostático. Y entre los dos miméticos de BH3 el ABT-737 es el más tóxico.

Compuestos	Dosis letal media a 24h
Ibrutinib	>10 μM
ABT-199	4 μM
ABT-737	0,3 μM

Tabla 1. Valores de dosis letal media para los compuestos Ibrutinib, ABT-199 y ABT-737 a 24horas, sobre la línea celular MM.1S.

5.2. EVALUACIÓN DE LA POSIBLE SINERGIA ENTRE EL IBRUTINIB Y DIFERENTES MIMÉTICOS DE “BH3-ONLY” SOBRE LA LÍNEA CELULAR MM.1S

Para comprobar si la actividad del Ibrutinib aumenta en presencia de ABT-199 y/o en presencia de ABT-737 se han llevado a cabo dos tipos de experimentos. Por un lado, se ha evaluado la viabilidad celular mediante el test de Mosmann modificado (20). Y por otro lado, se ha examinado mediante citometría de flujo la presencia de fosfatidilserina en la superficie celular, para establecer la cantidad de células muertas en presencia de los fármacos. En los anexos se muestra un experimento representativo.

5.2.1. EVALUACIÓN DE SINERGIA ENTRE IBRUTINIB Y ABT-199

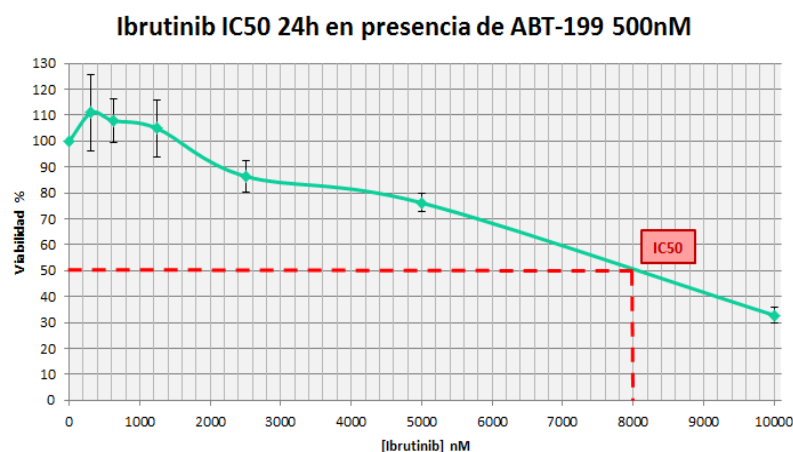


Figura 8. Viabilidad celular (%) tras 24 h en presencia de Ibrutinib a diferentes concentraciones, y una concentración de ABT-199 500nM en todas las muestras. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 24h.

Para evaluar la actividad del Ibrutinib en presencia de ABT-199 y poder comparar con su efecto en ausencia del mimético de “BH3-only”, establecemos la dosis letal media cuando se acompaña de ABT-199 500nM, a partir de la figura 8. En este caso, para 24 horas, al Ibrutinib le corresponde una IC₅₀ de 8 μ M. Esta es menor que la necesaria en ausencia de ABT-199, por lo que este último potencia el efecto citotóxico del Ibrutinib.

Evaluación de la muerte celular

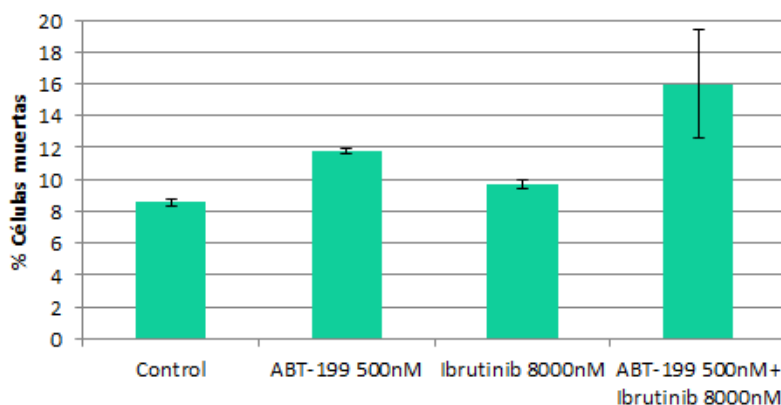


Figura 9. Células muertas (%) tras 24 h en presencia de Ibrutinib, ABT-199, los dos compuestos, o ausencia de fármacos. La muerte celular se ha analizado mediante marcaje con anexina V-FITC, tal y como se indica en el apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes.

Por otro lado, en la figura 9 se muestra que en presencia de ABT-199 el 11.8% de las células están muertas, en presencia de Ibrutinib el 9.7%, y en presencia de ambos el 15.9%. Por tanto, dado el número de células muertas utilizando los fármacos conjuntamente no es superior a la suma de las células muertas para cada fármaco por separado, no podemos afirmar que se produzca sinergia entre los 2 compuestos en la inducción de apoptosis. Esta aparente discrepancia con los resultados obtenidos mediante el test del MTT podrían indicar algún tipo de artefacto experimental o que la muerte celular no se produzca mediante apoptosis y por lo tanto no se produzca una exposición de fosfatidilserina en la mayor parte de las células. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que mediante el test de MTT se cuantifican tanto la inhibición del crecimiento como la posible citotoxicidad de un compuesto y los resultados en el caso del ibrutinib apuntan a un efecto citostático ya que no se observa una reducción drástica y total de la viabilidad tal y como sí sucede con ABT-199 y ABT-737.

5.2.2. EVALUACIÓN DE SINERGIA ENTRE IBRUTINIB Y ABT-737

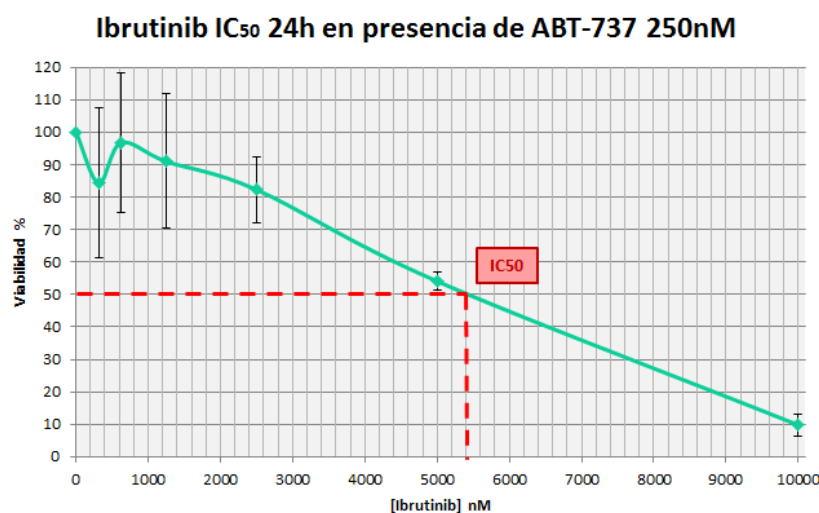


Figura 10. Viabilidad celular (%) tras 24 h en presencia de Ibrutinib a diferentes concentraciones, y una concentración de ABT-737 250nM en todas las muestras. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes. Líneas discontinuas representan la extrapolación de la dosis letal media a 24h

En el caso de evaluar la citotoxicidad del Ibrutinib en presencia de ABT-737 y comparar con su efecto en ausencia de este último, establecemos la dosis letal media cuando se acompaña de ABT-737 250nM, a partir de la figura 10. En este caso, para 24 horas, al Ibrutinib le corresponde una IC₅₀ de 5,4 μ M. Esta es menor que la necesaria en ausencia del mimético de “BH3-only”, por lo que podemos afirmar que el ABT-737 potencia el efecto del Ibrutinib.

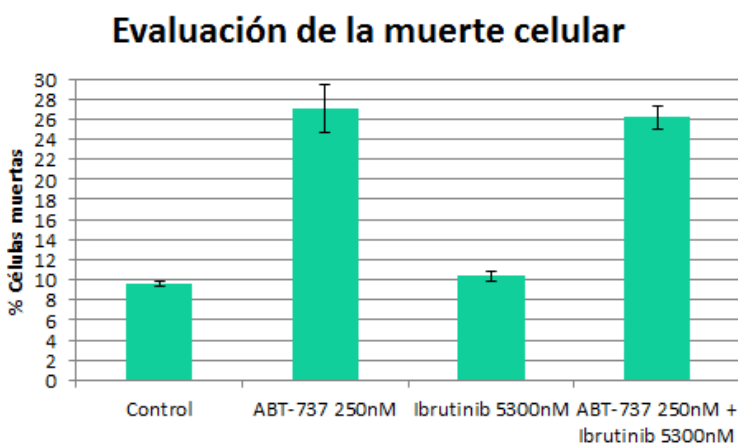


Figura 11. Células muertas (%) tras 24 h en presencia de Ibrutinib, ABT-737, los dos compuestos, o ausencia de fármacos. La muerte celular se ha analizado mediante marcaje con anexina V-FITC, tal y como se indica en el apartado 4.2.2. de Materiales y Métodos. Barras de error correspondientes a la desviación estándar de los resultados obtenidos para dos ensayos independientes.

Por otro lado, en la figura 11 se observa un porcentaje muy elevado de mortalidad para el ABT-737, pero no se puede apreciar diferencia con respecto a la combinación de los fármacos. Porque aunque para ambas columnas se ve diferencia entre los porcentajes de células muertas, esta diferencia no es significativa si consideramos la desviación estándar de los datos. A la vista de estos resultados no podemos afirmar que se produzca sinergia entre los 2 compuestos en la inducción de apoptosis. Tal y como se ha indicado para el ABT-199 con las técnicas empleadas no se puede descartar que se esté produciendo muerte celular mediante mecanismos alternativos a la apoptosis en los que no se produzca exposición de fosfatidilserina.

5.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La tinción de DNA con Hoechst 33342 nos permite apreciar la morfología de los núcleos, tal y como se muestra en las imágenes de la figura 12.

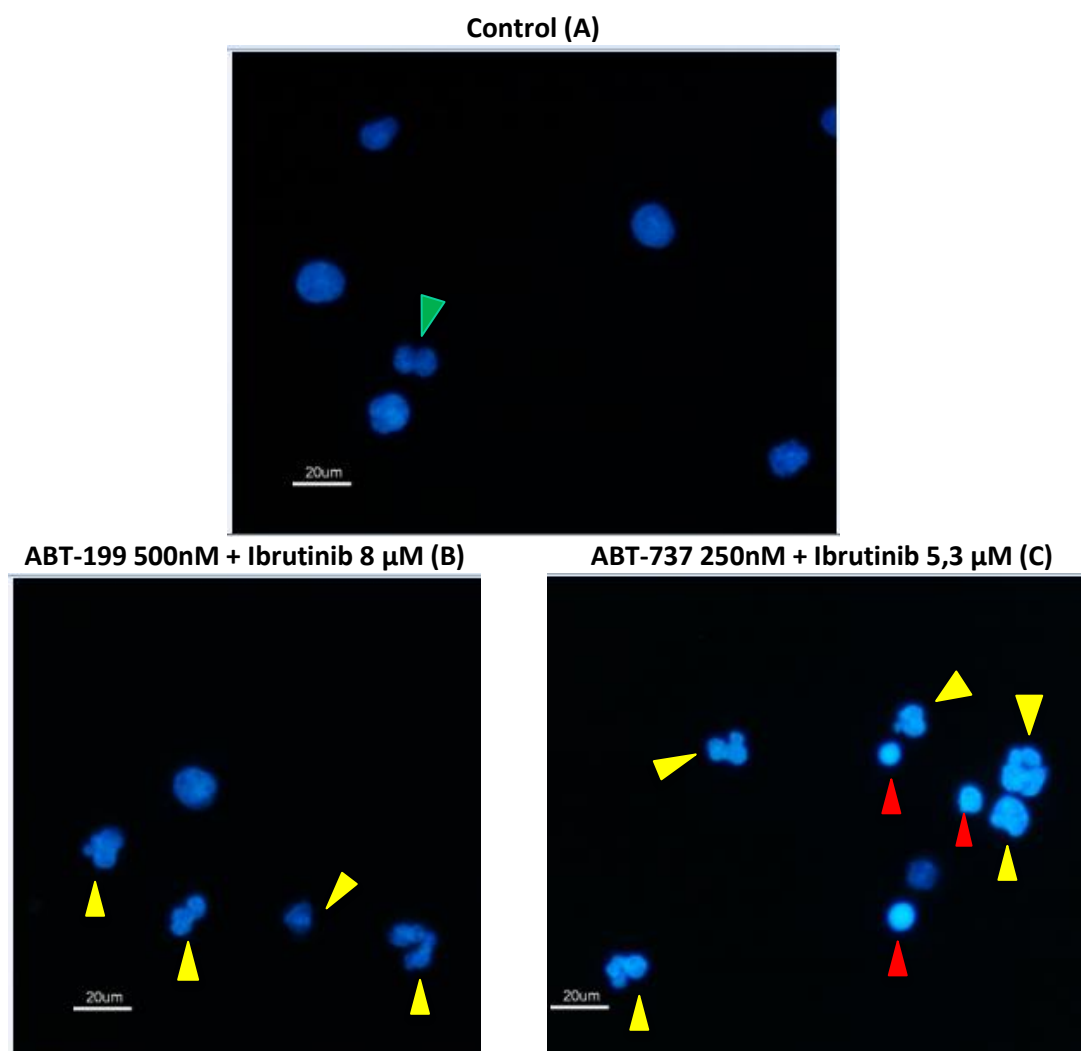


Figura 12. Tinción fluorescente con Hoechst 33342. (A) Corresponde al control, ilustra la morfología nuclear en ausencia de fármacos. Una cabeza de flecha verde marca un núcleo correspondiente a una célula en división. (B) Morfología nuclear de la muestra tratada con ABT-199 500nM e Ibrutinib 8μM durante 24h. Las cabezas de flecha amarillas señalan núcleos en arresto mitótico. (C) Morfología nuclear de la muestra tratada con ABT-737 250nM e Ibrutinib 5300nM durante 24h. Las cabezas de flecha amarillas señalan arrestos mitóticos y las rojas núcleos con la cromatina condensada. Imagen tomada con objetivo 40 x.

En la imagen A se muestran mayoritariamente núcleos de células en interfase, y señalado con una flecha verde se muestran dos núcleos resultado de una mitosis reciente o en estadios finales. Por otro lado, al tratar las células con los fármacos, imágenes B y C, aparecen varias células en arresto mitótico (puntas de flecha amarillas), se aprecian multimicronúcleos en las células. Y sólo en presencia de ABT-737 se ve un nivel de apoptosis significativo (puntas de flecha rojas), reflejado en una fluorescencia más intensa debida a la condensación de la cromatina.

Estos resultados nos llevan a pensar que el Ibrutinib, además de inhibir la Btk y que esto pueda dar lugar a apoptosis, es capaz de inducir la muerte celular mediante el mecanismo de catástrofe mitótica, es decir, dando lugar a una mitosis aberrante por daños irreparables en el DNA o alteraciones en el huso mitótico, que desencadena la formación de varios micronúcleos. Sin embargo, los miméticos de BH3 inducirían la muerte celular mediante apoptosis; en las imágenes B y C se refleja el mayor efecto citotóxico del ABT-737, puesto que hay un mayor número de células apoptóticas en la imagen C (aunque en la imagen B no aparece ninguna célula apoptótica, sí que había alguna célula con estas características en la preparación).

Esta hipótesis permite explicar los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad previos. Por un lado, el menor valor de IC_{50} para Ibrutinib en 24 horas en presencia de los ABTs, nos permite afirmar que los miméticos de BH3 aumentan la sensibilidad de las células al inhibidor de la Btk. Por ello en las imágenes B y C aparecen muchas menos células vivas que en el control. Por otro lado, en los experimentos de citometría veíamos que la cantidad de células muertas en presencia de Ibrutinib no era mucho mayor al control, esto se debería a que el mecanismo principal de inducción de muerte por Ibrutinib es la catástrofe mitótica. Este mecanismo no implica la translocación de la fosfatidilserina, por lo que en los ensayos hemos infravalorado el número de células muertas, considerando vivas aquellas células que habrían muerto por catástrofe mitótica. Del mismo modo, se explica que el porcentaje de células muertas para las combinaciones de fármacos sea prácticamente igual que para la sola presencia de los ABTs, pues sólo estamos considerando las células muertas por apoptosis, mecanismo inducido por los miméticos de BH3 pero no tanto por Ibrutinib.

La inducción de arresto mitótico por Ibrutinib podría deberse a la inhibición de quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular, además de Btk. Una de estas enzimas podría ser la quinasa Janus-activada (JAK), para la cual se ha visto que su inactivación reduce el crecimiento celular y produce arresto en la fase del ciclo celular G_2 (21). Estudios han demostrado que esta enzima puede ser inhibida por Ibrutinib, este hecho se ve favorecido por la presencia en JAK de un residuo de cisteína alineado con Cys-481 de Btk, el cual veíamos era el punto de unión para Ibrutinib en Btk (22). Por otro lado, en las células en las que la quinasa ERK está inhibida es necesaria la señalización mediada por JAK para el tránsito G_2 -M (21), al tratar las células con Ibrutinib inhibimos la Btk impidiendo la fosforilación de ERK necesaria para su activación (22), por lo que la inhibición de JAK junto con la de Btk explicaría el arresto mitótico de nuestras células tratadas.

5.4. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE Bcl-2

Para comprobar el efecto del ibrutinib sobre la fosforilación de Bcl-2 se realizó un Western-Blot, utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de Bcl-2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

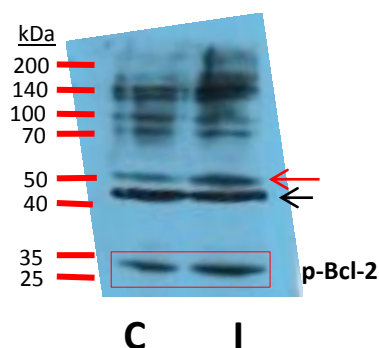


Figura 13. Efecto del ibrutinib sobre la fosforilación de Bcl-2. Se evaluó mediante Western Blot la presencia de Bcl-2 fosforilada en 2 extractos celulares, uno de ellos tras 24 horas en presencia de ibrutinib 10 μ M (carril derecho), y otro en ausencia de este (carril izquierdo). Control de carga realizado mediante el revelado de la β -actina sobre la misma membrana (banda señalada por flecha negra).

Las bandas correspondientes a Bcl-2 fosforilado son las recuadradas en rojo, porque Bcl-2 tiene un peso molecular de 26kDa. Por el grosor de las bandas podemos ver que hay mayor fosforilación de Bcl-2 en las células tratadas con ibrutinib, de forma que ibrutinib no inhibe quinasas implicadas en la fosforilación de Bcl-2. La mayor modificación post-traducciona en presencia del fármaco corrobora la hipótesis anteriormente planteada de que ibrutinib induce la muerte celular por arresto mitótico; pues se ha visto que Bcl-2 es fosforilado preferentemente durante mitosis, aumentando su afinidad por Bak y Bim, como consecuencia a un cambio conformacional en su dominio bucle (10). Por lo tanto, en presencia de ibrutinib las células que entran en mitosis sufren arresto mitótico quedando detenidas en esta fase, en la que aumenta la fosforilación de Bcl-2. Por el contrario, en el control las células una vez se han dividido vuelven a interfase, etapa del ciclo en la cual sobre Bcl-2 actúan fosfatasa dando lugar a una conformación de la proteína con menor actividad antiapoptótica.

En la figura 13 también podemos ver otro par de bandas bastante definidas, señaladas por la flecha roja, por la distancia que han recorrido tienen un peso molecular en torno a 50 KDa. Por tanto podría tratarse de un heterodímero Bcl-2-Bim o Bcl-2-Bak, dado que estas proteínas proapoptóticas tienen unos pesos moleculares de 22kDa y 23KDa respectivamente. Además, la banda es más gruesa para la muestra tratada con ibrutinib lo que apoya la hipótesis de que se trate de uno de estos dímeros porque como ya se ha comentado anteriormente en mitosis se aumenta la fosforilación de Bcl-2, lo que favorece su unión a Bim y Bak.

Los marcajes que aparecen en la parte superior corresponden a uniones inespecíficas del anticuerpo.

6. CONCLUSIONES

- Las células de mieloma múltiple MM.1S son sensibles a los miméticos de BH3 ABT-737 ($IC_{50}=0.3 \mu M$) y ABT-199 ($IC_{50} 4 \mu M$).
- Ibrutinib tiene un efecto citostático sobre las células MM.1S ($IC_{50}>10 \mu M$ a 24 h, $IC_{50}=7,4 \mu M$ a 48 h).
- El mecanismo de actuación principal del Ibrutinib en células MM1.S es la inducción de catástrofe mitótica.
- Tanto ABT-199 como ABT-737 aumentan la sensibilidad de la línea celular MM.1S a Ibrutinib.
- Ibrutinib induce la fosforilación de Bcl-2

CONCLUSIONS

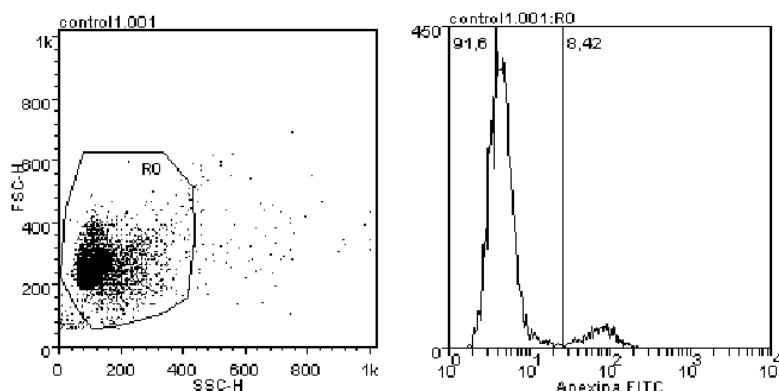
- MM.1S multiple myeloma cells are sensitive to ABT-737 ($IC_{50}=0.3 \mu M$) and ABT-199 ($IC_{50} 4 \mu M$), which are BH3 mimetic compounds.
- Ibrutinib has a cytostatic effect on cell line MM.1S ($IC_{50}>10 \mu M$ at 24 h, $IC_{50}=7,4 \mu M$ at 48 h).
- The main mechanism of action of Ibrutinib on MM.1S cells is the induction of mitotic catastrophe.
- Both the ABT-199 and the ABT-737 increase cell line MM.1S sensitivity to Ibrutinib.
- Ibrutinib induces the phosphorylation of Bcl-2.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rushworth SA, Bowles KM, Barrera LN, Murray MY, Zaitseva L, MacEwan DJ. BTK inhibitor ibrutinib is cytotoxic to myeloma and potently enhances bortezomib and lenalidomide activities through NF- κ B. *Cell Signal*. 2013 Jan;25(1):106–12.
2. Tai Y-T, Anderson KC. Bruton's tyrosine kinase: oncotarget in myeloma. *Oncotarget*. 2012 Sep 12;3(9):913–4.
3. Shinnars NP, Carlesso G, Castro I, Hoek KL, Corn RA, Woodland RL, et al. Bruton's Tyrosine Kinase Mediates NF- κ B Activation and B Cell Survival by B Cell-Activating Factor Receptor of the TNF-R Family [Internet]. [cited 2015 Jun 18]. Available from: <http://www.jimmunol.org>
4. Chung-Shien L, Mohammad AR, Sara SK. A review of a novel, Bruton's tyrosine kinase inhibitor, ibrutinib. *J Oncol Pharm Pract* November 25, 2014 1078155214561281.
5. Patricia Galán Malo. Papel de las proteínas de la familia BCL-2 en la apoptosis inducida por fármacos antitumorales. Universidad de Zaragoza. 2010.
6. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Semin Hematol*. 2014 Jul 1;51(3):219–27.
7. Jeong S-Y, Seol D-W. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 2008 Jan 31;41(1):11–22.
8. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):334–6.
9. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205–19.
10. Dai H, Ding H, Meng XW, Lee S-H, Schneider PA, Kaufmann SH. Contribution of Bcl-2 Phosphorylation to Bak Binding and Drug Resistance. *Cancer Res*. 2013 Dec 1;73(23):6998–7008.
11. Ruvalo PP, Deng X, May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*. 2001 Apr;15(4):515–22.
12. Marzo I, Naval J. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2008 Oct 15;76(8):939–46.
13. Patricia Balsas Claveria. Mecanismo de muerte inducida por el inhibidor del proteasoma bortezomib en células de mieloma. Efecto de su combinación con apo2l/trail y melfalán. Universidad de Zaragoza. 2011.
14. Billard C. BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments. *Mol Cancer Ther*. 2013 Sep 1;12(9):1691–700.
15. Ng SY, Davids MS. Selective Bcl-2 inhibition to treat chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014 Apr;12(4):224–9.

16. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Levenson JD, Souers AJ, et al. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):210–2.
17. Mieloma múltiple: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2015 May 17]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000583.htm>
18. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2014 Apr;14(4):219–32.
19. Hoja del producto ATCC: MM.1S (ATCC CRL-2974).
20. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988 Feb 1;48(3):589–601.
21. Reiterer G, Yen A. Inhibition of the Janus Kinase Family Increases Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation and Causes Endoreduplication. *Cancer Res*. 2006 Sep 15;66(18):9083–9.
22. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Louny D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jul 20;107(29):13075–80.

Anexo 1. Resultados de un experimento de citometría de flujo representativo.



En el diagrama de puntos situado a la izquierda cada punto representa un elemento individual, bien células o fragmentos de estas, y nos da información sobre:

- Forward (FSC-H): se refiere al tamaño relativo de la célula, a mayor tamaño mayor valor. Lo que ha medido es la dispersión frontal de la luz incidente a la que da lugar la célula. Aparece representado en el eje de las abscisas.
- Side Scatter (SSC-H): se refiere a la granularidad o complejidad citoplasmática de la célula, a mayor rugosidad tiene un valor más elevado. Mide la dispersión lateral. Aparece representado en el eje de ordenadas.

Sobre este diagrama seleccionamos la región R0 para evaluar su fluorescencia, por su tamaño y rugosidad en su mayoría se tratará de células completas.

Por otro lado, en el gráfico de la derecha se muestra la fluorescencia relativa para los elementos de la región R0. En el eje de ordenadas viene representado el número de células y en el de abscisas el incremento de la intensidad. La línea vertical separa la intensidad correspondiente a las células vivas (izquierda) y las muertas (derecha). El porcentaje de células muertas (situado a la derecha de la línea vertical) es el que se ha utilizado para los gráficos expuestos en el apartado de resultados.